

家族性噬血细胞综合征临床特征及基因突变分析

周百灵 黄体龙 庄宇 世淑兰 赵广周 夏世梅 奎莉越*

[摘要] **目的** 对4例家族性噬血细胞综合征患儿进行临床表型分析和基因变异检测,明确其分子病因。**方法** 选取2018至2021年到昆明市儿童医院检验科采血的患儿进行病史采集,体格检查,血常规,血生化,腹部彩超,骨髓细胞学形态等检查确诊为家族性噬血细胞综合征的4例患儿,获取外周血DNA对患儿进行高通量测序,并针对变异位点对家系成员进行Sanger测序验证。**结果** 4例患儿均因高热就诊,完善临床检查,患儿血相异常,血细胞减少(2系以上细胞受累),肝/脾大,纤维蛋白原下降,血清铁蛋白、血清甘油三酯升高,骨髓发现噬血细胞现象,未见恶性肿瘤细胞。对4例患儿进行基因检测,其中,3例患儿 *PRF1* (NM_001083116.2) 基因 c.1349C>T (p.T450M) 纯合突变,1例患儿 *UNC13D* (NM_199242.2) 基因 c.3134C>T/c.754-8C>T (p.T1045M/p) 复合杂合突变。两个基因的错义突变位点在多个同源物种间高度保守,本次检测出一个新的内含子变异。综合临床表现及基因检测结果,3例患儿诊断为家族性噬血性淋巴组织细胞增生症2型(OMIM:603553),1例患儿诊断为家族性噬血细胞综合征3型(OMIM:608898)。**结论** *PRF1*、*UNC13D* 基因突变可能是4例患儿的致病原因。

[关键词] 家族性噬血细胞综合征; *PRF1* 基因; *UNC13D* 基因; 基因突变

DOI:10.19930/j.cnki.jmdt.2023.07.010

Clinical features and gene mutation analysis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis

ZHOU Bailing, HUANG Tilong, ZHUANG Yu, SHI Shulan, ZHAO Guangzhou, XIA Shimei, KUI Liyue*
(Department of Clinical Laboratory, Kunming Children's Hospital, Kunming, Yunnan, China, 650228)

[ABSTRACT] **Objective** To analyze the clinical phenotype and screen the genetic mutations in four children with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis to clarify their molecular biology etiology. **Methods** From 2018 to 2021, 4 children who were diagnosed with familial hemophagocytic syndrome by medical history collection, physical examination, blood routine, blood biochemistry, abdominal color Doppler ultrasound, bone marrow cytology. DNA was extracted from patients' peripheral blood for high-throughput sequencing, and Sanger sequencing was performed on family members for mutation sites. **Results** All four patients presented with fever. A complete clinical examination was performed, and the results showed that the children had abnormal blood items, cytopenia (involvement of more than two lineage cells), liver/spleen enlargement, decreased fibrinogen, and increased serum ferritin and serum triglycerides. Hemophagocytosis can be observed in bone marrow, and malignant cells were not found. Gene sequencing was performed in 4 children. Among which three patients had a homozygous mutation in the *PRF1* (NM_001083116.2) gene c.1349C>T (p.T450M), and one patient had a homozygous mutation in the *UNC13D* (NM_199242.2) gene c.3134C>T/c.754-8C>T (p.T1045M/p) compound heterozygous mutation. The missense mutation sites of the two genes are highly conserved across multiple homologous species, and a novel intronic variant was detected. Combined with clinical manifestations and genetic testing results, three children were diagnosed with familial hemophago-

基金项目:昆明市卫生科研项目(2020-11-01-122);昆明市卫生科技人才培养项目(2022-SW(技术)-007)

作者单位:昆明市儿童医院检验科,云南,昆明 650228

*通信作者:奎莉越, E-mail: kuiliyue@etyy.cn

cytic lymphohistiocytosis type 2 (OMIM: 603553), and one child was diagnosed with familial hemophagocytic syndrome type 3 (OMIM: 608898). **Conclusion** *PRF1* and *UNC13D* gene variants may be the pathogenic causes of 4 cases.

[KEY WORDS] Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; *PRF1* gene; *UNC13D* gene; Genetic mutation

噬血细胞综合征,又称噬血细胞性淋巴组织细胞增多症(Hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH),是一种以T淋巴细胞和巨噬细胞过度激活和过度增殖为特征的免疫缺陷病^[1]。HLH分为原发性和继发性两种类型,原发性HLH包括家族性HLH(Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis, FHL)和遗传性免疫缺陷相关HLH。原发性HLH为常染色体隐性遗传,通常发生于儿童,继发性HLH常与感染、恶性肿瘤、风湿免疫性疾病相关^[2-4]。HLH导致患者骨髓、肝、脾、脑等器官的浸润和损伤。家族性HLH通常表现为一种急性性疾病,伴有长期高烧,细胞减少,肝脾肿大,凝血功能障碍,血细胞减少,高铁蛋白血症和NK细胞溶解活性减弱或缺失^[1,5]。HLH由与细胞毒性T淋巴细胞和自然杀伤(Natural killer, NK)细胞内分泌性溶酶体的形成和功能相关基因的突变引起。FHL包括5个亚型(FHL1-FHL5),已知4个致病基因:*PRF1*(FHL2)、*UNC13D*(FHL3)、*STX11*(FHL4)、*STXBP2*(FHL5)^[6-7],FHL1的致病基因尚未清楚。本研究探讨4例HLH患儿的临床特点,并对患儿进行基因测序,结合生物信息学分析,明确了*PRF1*、*UNC13D*基因突变是患儿的分子生物学致病原因。

1 材料和方法

1.1 患儿一般情况

选取2018至2021年到昆明市儿童医院检验科采血的4例患儿,来自云南地区,年龄2~10岁,2男2女,均因“发热”入院就诊,体温37.8℃~40.0℃,其中有两例患儿出现腹痛或腹泻症状。收集患儿和家系成员的临床资料,系统进行全面体格检查。本研究经院医学伦理委员会批准同意,基因诊断取得患儿家属的同意并签署知情同意书(患儿由监护人代签)。

1.2 实验室检查

1.2.1 常规检查

进行血常规,血生化,凝血功能,免疫学,腹部彩超等常规实验室检查。

1.2.2 骨髓细胞学检查

通过骨髓穿刺术抽取患儿骨髓组织,涂片、干燥,进行瑞氏染色/吉姆萨染色,镜检。

1.3 基因分析

经患儿家属同意,留取患儿及其父母静脉血3 mL,采用高通量测序技术分析免疫疾病相关基因,根据ACMG(American College of Medical Genetics and Genomics)指南判定变异位点的致病性。通过Sanger测序方法验证患儿所发现的突变及父母源性检测。

2 结果

2.1 临床检测结果

4例患儿均存在发热,肝/脾大,血细胞减少(2系以上细胞受累),铁蛋白升高,高甘油三酯血症,低纤维蛋白原血症,凝血功能障碍,骨髓出现噬血现象,1例患儿NK细胞活性下降。见表1、图1。

2.2 基因检测结果

患儿1、2、3分别检出*PRF1*基因c.1349C>T(p.T450M)纯合突变,为错义突变,导致编码的第450位苏氨酸被甲硫氨酸代替。Sanger测序进行家系验证,3例患儿的父母均为*PRF1* c.1349C>T杂合携带者,以上突变分别遗传自他们的父母。患儿4*UNC13D*基因31号外显子存在c.3134C>T(p.T1045M)杂合突变,且*UNC13D*基因9号内含子区域存在c.754-8C>T杂合突变,Sanger测序证实c.3134C>T杂合突变来自于其母亲,c.754-8C>T杂合突变来自于其父亲,2个变异为复合杂合突变,符合常染色体隐性遗传。见图2。其中,c.754-8C>T位点未被HGMD数据库收录,属于新发变异。见表2。

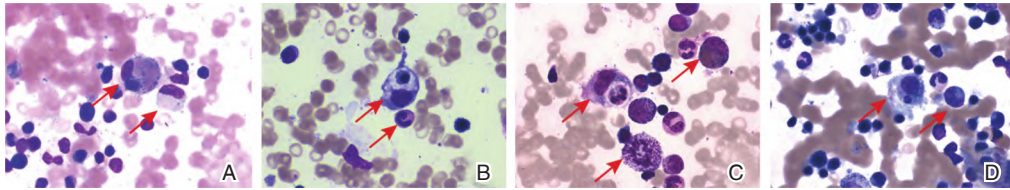
3 讨论

HLH临床表现复杂且缺乏特异性,临床早期诊断难度较大。根据2022年国际组织细胞协会修订标准诊断本研究4例患儿^[10]。

表1 4例HLH患儿主要临床检查结果

Table 1 Main clinical findings of four children who with HLH

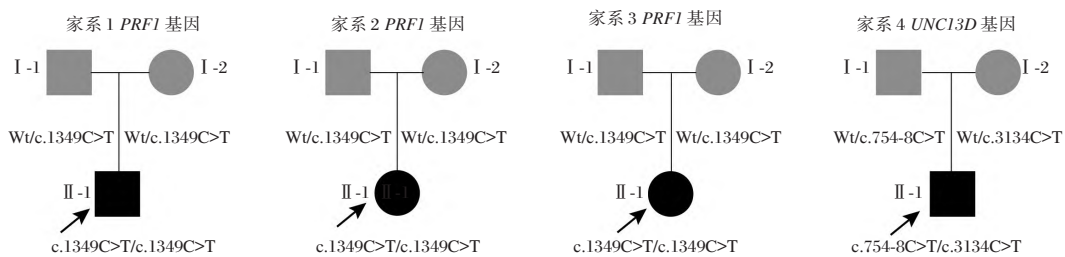
	主要指标	患儿1	患儿2	患儿3	患儿4	参考值
一般情况	性别	男	女	女	男	
	年龄	10岁	9岁3月	10岁11月	2岁4月	
血常规	发病症状	发热	发热,腹痛	发热	发热,腹泻	
	白细胞	1.07 ↓	3.75 ↓	2.15 ↓	3.75 ↓	5~12×10 ⁹ /L
	中性粒细胞绝对值	0.44 ↓	0.70 ↓	0.67 ↓	0.93	0.88-5.7×10 ⁹ /L
	红细胞	3.88 ↓	2.77 ↓	3.57 ↓	4.24 ↓	4.41×10 ¹² /L
	血红蛋白	102.00 ↓	73.00 ↓	91.00 ↓	116.00	110~148 g/L
血生化	血小板	24.00 ↓	65.00 ↓	40.00 ↓	247.00	100~450×10 ⁹ /L
	丙氨酸转氨酶	300.00 ↑	18.00	27.00	254.00 ↑	0~40 U/L
	天冬氨酸转氨酶	366.00 ↑	35.00	51.00 ↑	79.00 ↑	<40 U/L
	甘油三酯	6.59 ↑	2.81 ↑	4.82 ↑	135.00 ↑	<1.13 mmol/L
凝血功能	胆固醇	2.23 ↓	1.69 ↓	2.05 ↓	4.96	2.8~6.5 mmol/L
	凝血酶原时间	13.10 ↑	14.30 ↑	13.30 ↑	13.00	11~13s
	APTT	41.90 ↑	37.80 ↑	41.50 ↑	42.70 ↑	23~37s
免疫学	纤维蛋白原	1.50 ↓	2.07 ↓	1.37 ↓	1.89 ↓	200~400 mg/L
	血清铁蛋白	3 100.00 ↑	653.30 ↑	901.20 ↑	1030.00 ↑	10~291 ng/mL
	T细胞亚群	CD4 ⁺ :47.22 CD8 ⁺ :20.41	CD4 ⁺ :47.43 CD8 ⁺ :23.52	CD4 ⁺ :58.80 CD8 ⁺ :19.60	CD4 ⁺ :31.50 CD8 ⁺ :17.52 ↓	CD4 ⁺ :27%~53% CD8 ⁺ :19%~34%
	NK细胞	2.37 ↓	5.73 ↑	6.73 ↑	27.93 ↑	4%~23%
其它	腹部彩超	肝稍大,脾脏中度肿大		脾大	脾脏中度肿大	肝稍大
	骨髓检查	可见噬血细胞	可见噬血细胞	可见噬血细胞	可见噬血细胞	



注:100×,油镜瑞吉染色结果。骨髓中可见明显的吞噬现象(红色箭头),未发现恶性肿瘤的迹象;A、B、C和D分别代表患儿1、2、3和4。

图1 4例HLH患儿的骨髓检查结果

Figure 1 Bone marrow examination results of four patients with HLH



注:方框代表男性,圆圈代表女性;黑色代表患者,灰色代表携带者。

图2 4例患儿家系图

Figure 2 Family pedigree of four patients

表2 4例HLH患儿的基因检测结果

Table 2 Gene sequence of four patients with HLH

患者	基因	外显子/内含子	cDNA	氨基酸	纯合/杂合	ACMG	来源	文献
患儿1	<i>PRF1</i>	Extron3	c.1349C>T	p.T450M	纯合	Pathogenic	父母杂合携带	[8]
患儿2	<i>PRF1</i>	Extron3	c.1349C>T	p.T450M	纯合	Pathogenic	父母杂合携带	[8]
患儿3	<i>PRF1</i>	Extron3	c.1349C>T	p.T450M	纯合	Pathogenic	父母杂合携带	[8]
患儿4	<i>UNC13D</i>	Extron31	c.3134C>T	p.T1045M	杂合	VUS	母亲杂合携带	[9]
患儿4	<i>UNC13D</i>	Intron9	c.754-8C>T	p.?	杂合	VUS	父亲杂合携带	Novel

注:VUS, variants of uncertain significance,临床意义未明的变异。

FHL有5个亚型(FHL1-FHL5),大约70%的FHL是由*PRF1*或*UNC13D*的功能突变缺失引起的^[5],*PRF1*是编码穿孔素的基因,穿孔素是溶解性囊泡的关键载体,*UNC13D*编码Munc13-4,是T细胞和NK细胞释放溶解性囊泡的关键^[11]。陈雪等^[12]对265名来自中国的噬血细胞性淋巴组织细胞增多症患者进行基因分析,在87名(32.8%)患者中观察到遗传变异,其中36名(13.6%)在*UNC13D*中出现变体,18名(6.8%)在*PRF1*中出现变体。本研究对4个家系进行二代测序,结合临床检查和基因检测结果,患儿1、2、3*PRF1*基因c.1349C>T纯合突变,诊断为FHL2;患儿4*UNC13D*基因c.3134C>T/c.754-8C>T复合杂合突变,诊断为FHL3。*UNC13D*基因c.754-8C>T位点未有文献报道其致病性,千人基因组数据库中该位点突变频率为0.000199681,突变率极低,根据ACMG判定为临床意义未明的变异。

*PRF1*基因位于10号染色体q21-22,共3个外显子,其中,1号外显子不参与编码,2号和3号外显子编码555个氨基酸残基构成的穿孔素蛋白。*PRF1*基因编码的穿孔素蛋白包括MACP/CDC结构域(22~375氨基酸)、上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)结构域(316~412氨基酸)和C2结构域(氨基酸残基413~540)^[13]。C2结构域因具有磷脂结合活性,在介导穿孔素蛋白与靶细胞膜脂质双分子层结合中发挥关键作用,是穿孔素插入靶细胞的必要结构^[14]。本研究中患儿1、2、3,*PRF1*基因3号外显子c.1349C>T(p.T450M)纯合变异位于C2结构域,可能影响蛋白质的功能,已有多篇文献报道该变异位点在FHL患者中检出,致病性等级较强。

*UNC13D*基因编码Munc13-4,是T细胞和NK细胞释放溶解性囊泡的关键蛋白^[11]。*UNC13D*基因包含32个外显子和31个内含子^[15],在报道的文献中,发生在外显子和内含子中突变的患者分别占53.4%和46.6%,严重特征患者的外显子突变比内含子突变高近1.6倍,而轻度特征患者的外显子突变和内含子突变频率几乎相等^[16]。研究表明,*UNC13D*基因的剪接突变是FHL3患者的常见突变形式,内含子1(13.0%)、9(11.5%)和30(8.0%)是3个较常见的变异位置^[16]。*UNC13D*基因外显子和剪接位点外的变异是FHL3的常见原因,提示对整个*UNC13D*基因(编码区和非编码

区)的测序似乎是准确诊断FHL3患者最合适的方式。Amirifar等^[16]对73名重度和249名轻度FHL3患者进行回顾性统计研究,结果证实:发热、肝脾肿大和噬血细胞增多症是FHL3的常见临床特征。此外,纤维蛋白原和NK细胞活性降低,以及铁蛋白和甘油三酯升高,是早期诊断FHL3疾病的重要标志物。

研究表明,虽然FHL1-FHL5的致病基因各不相同,但都涉及淋巴细胞的先天缺陷及功能受损,特别是细胞毒性细胞,如NK细胞、细胞毒性T细胞和T调节细胞,这些细胞通常介导免疫系统和其他组织内感染和炎症状况的控制^[4]。细胞毒性T细胞在造血发育过程中形成,包括含有穿孔素蛋白和颗粒酶B的颗粒,FLH患者中这些细胞可能相互作用,阻断触发凋亡或激活诱导凋亡机制,NK细胞和细胞毒性T细胞不能有效杀死靶细胞,造成免疫反应过度激活,持续的高炎症状态,发热,贫血,出血,肝脾肿大和中枢神经系统症状等HLH常见症状^[17-18]。然而,这些症状并非特异性表现,临床不一定能在第一时间做出明确诊断;另一方面,许多患者往往并不同时出现多个相关的临床表现,不能严格达到HLH-2004诊断标准,极易误诊或延误诊断。因此,对于疑似患者,推荐进行全面临床检查和基因检测,及早诊断。

综上所述,本研究报告了4例FHL,3例患儿为*PRF1*纯合突变导致的FHL2,1例患儿为由*UNC13D*复合杂合突变导致的FHL3,为临床诊断提供参照。

参考文献

- [1] Ponnatt TS, Lilley CM, Mirza KM. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2022, 146(4): 507-519.
- [2] Brisse E, Matthys P, Wouters CH. Understanding the spectrum of haemophagocytic lymphohistiocytosis: update on diagnostic challenges and therapeutic options[J]. Br J Haematol, 2016, 174(2): 175-187.
- [3] Wysocki CA. Comparing hemophagocytic lymphohistiocytosis in pediatric and adult patients[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2017, 17(6): 405-413.
- [4] Canna SW, Marsh RA. Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. Blood, 2020, 135(16): 1332-1343.
- [5] Griffin G, Shenoi S, Hughes GC. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: An update on pathogenesis, diagnosis, and therapy[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2020, 34(4): 101515.

- [6] Filipovich AH, Chandrakasan S. Pathogenesis of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2015, 29(5): 895-902.
- [7] 丁秋琳,郭霞,李强. 迟发性家族性噬血细胞综合征及严重中枢神经系统病变患儿的基因变异分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2019, 36(6): 592-594.
- [8] Chia J, Yeo KP, Whisstock JC, et al. Temperature sensitivity of human perforin mutants unmasks subtotal loss of cytotoxicity, delayed FHL, and a predisposition to cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(24): 9809-9814.
- [9] Miao Y, Zhu H, Qiao C, et al. Pathogenic Gene Mutations or Variants Identified by Targeted Gene Sequencing in Adults With Hemophagocytic Lymphohistiocytosis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 395.
- [10] Henter J, Horne A, Aricó M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2007, 48(2): 124-131.
- [11] Galgano D, Soheili T, Voss M, et al. Alternative UNC13D Promoter Encodes a Functional Munc13-4 Isoform Predominantly Expressed in Lymphocytes and Platelets [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1154.
- [12] Chen X, Wang F, Zhang Y, et al. Genetic variant spectrum in 265 Chinese patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular analyses of PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2, SH2D1A, and XIAP [J]. *Clin Genet*, 2018, 94(2): 200-212.
- [13] Willenbring R, Johnson A. Finding a Balance between Protection and Pathology: The Dual Role of Perforin in Human Disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1608.
- [14] Law RHP, Lukoyanova N, Voskoboinik I, et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin [J]. *Nature*, 2010, 468(7322): 447-451.
- [15] Meeths M, Chiang SCC, Wood SM, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) caused by deep intronic mutation and inversion in UNC13D [J]. *Blood*, 2011, 118(22): 5783-5793.
- [16] Amirifar P, Ranjouri MR, Abolhassani H, et al. Clinical, immunological and genetic findings in patients with UNC13D deficiency (FHL3): A systematic review [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2021, 32(1): 186-197.
- [17] Sung L, Weitzman SS, Petric M, et al. The role of infections in primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: a case series and review of the literature [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 33(10): 1644-1648.
- [18] Nandhakumar D, Loganatha A, Sivasankaran M, et al. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Children [J]. *Indian J Pediatr*, 2020, 87(7): 526-531.

(上接第 1172 页)

- [2] 吴嘉,印中鹏,席可,等. 急性缺血性卒中和短暂性脑缺血发作患者血清 C1q 水平检测的临床价值 [J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(9): 894-900.
- [3] Goebel CH, Karstedt SC, Munte TF, et al. Explicit Diagnostic Criteria for Transient Ischemic Attacks Used in the Emergency Department Are Highly Sensitive and Specific [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2021(1): 50-58.
- [4] 师媛,王晓娟. 短暂性脑缺血发作患者颈动脉狭窄程度与颈动脉斑块易损性关系及对近期缺血性脑卒中的预测价值研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2022, 51(4): 454-457+496.
- [5] 陈健,赵映,何怡华,等. 阵发性心房颤动病人左心房形态变化及其与脑卒中/短暂性脑缺血发作的关系 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(24): 4357-4361.
- [6] 徐原科,周正,李贺恒,等. 后循环短暂性脑缺血发作患者血浆 D-二聚体、纤维蛋白原、血小板的变化 [J]. *临床检验杂志*, 2020, 38(5): 356-358.
- [7] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南 2014 [J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48(4): 258-273.
- [8] 陈小飞,刘文青,王建红,等. ABCD3 I 评分对短暂性脑缺血发作病人近期脑梗死风险的评估 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015(4): 474-477.
- [9] 王桂红,王拥军. 急性脑梗死的欧洲治疗指南 [J]. *国外医学(脑血管疾病分册)*, 2001, 9(2): 101-103.
- [10] Singh A, Dees S, Grewal IS. Overcoming the challenges associated with CD3+T-cell redirection in cancer. *Br J Cancer*, 2021, 124(6): 1037-1048.
- [11] 俞璐,刘会芳. “治未病”理论指导下探讨各证型后循环短暂性脑缺血发作与低密度脂蛋白和同型半胱氨酸的关系 [J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(1): 21-24+221.
- [12] 王园,丰宏林. 影像学表现及血清学标志物在短暂性脑缺血发作及其预后中的价值 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2020, 28(2): 127-129.
- [13] 谷晓林,李婷婷,魏丽萍. 短暂性脑缺血发作患者血清 CXCL12 水平与 ABCD2 评分及预后的相关性 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2020, 15(7): 425-426.
- [14] Wang K, Huang W, Chen R, et al. Di-methylation of CD147-K234 Promotes the Progression of NSCLC by Enhancing Lactate Export [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(1): 160-173.e6.
- [15] 高鹏举,赵臻. 短暂性脑缺血发作卒中患者抗凝血酶-III 水平与复发的相关性分析 [J]. *贵州医药*, 2022, 46(9): 1374-1375.